秦巴山区野生百合(*Lilium* spp.)的育种应用研究

王仙芝[1,2]，牛立新[1]，谢松林[3*]，罗建让[1]

（1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院，陕西 杨凌 712100；2. 招商局漳州开发区有限公司，福建 漳州 363100；3. 四川七彩林科股份有限公司，四川 巴中 636600）

摘要：为探索秦巴山区野生百合资源在百合育种中的应用方向及途径，获得具有其独特遗传背景的育种材料，将秦巴山区野生百合的抗病毒及独特观赏特性等优良遗传性状渐渗到栽培品种中去，该文借助切割柱头杂交及胚抢救技术，选取 6 种秦巴山区野生百合（岷江百合 *Lilium Regale*、宜昌百合 *L. leucanthum*、山丹 *L. pumilum*、野百合 *L. Brownii*、宝兴百合 *L. duchartrei*、川百合 *L. davidii*）及亚洲百合（Asiatic hybrids，AA）品种‘Elite’、东方百合（Oriental hybrids，OO）品种‘Sorbonne’、‘Siberia’和‘Marlon’及 OT 百合（Oriental×Trumpet hybrids，OT）品种‘Yelloween’、‘Serano’、‘Corel'door’进行了 32 组共计 263 朵花的（品）种间杂交，并针对膨大变软的果实剥离可供离体培养的胚及胚囊进行胚抢救。结果显示：（1）不同杂交组合坐果率、胚获得及萌发率呈现较大差异，综合坐果率为 11.4%，共计对 30 个膨大的果实中的 38 个可供离体培养的胚及胚囊进行胚抢救，最终 7 株萌发。（2）以野生百合为父母本的 12 组杂交组合中，5 组获得了膨大果实，得到了 6 株杂交后代。（3）栽培百合做母本，野生百合做父本的 20 组杂交中，共 9 组获得了膨大果实，除‘Elite’×山丹可直接收获种子外，共得到 1 株杂交后代。（4）以岷江百合及宜昌百合为亲本的远缘杂交 TT×AA 及回交 OT×TT 成功获得杂种后代。（5）秦巴山区 6 种野生百合在远缘杂交中获得育种后代的几率存在较大差异，宜昌百合和岷江百合获得后代几率较高，宝兴百合获得后代几率较低，而野百合未获得后代。试验表明岷江百合和宜昌百合为母本的 TT×AA 杂交，宝兴百合为父本的 TT×AA 杂交及岷江百合和宜昌百合为父本的 OT 回交为三种百合的育种利用提供了新途径；野百合的育种应用途径需继续探索。

关键词：秦巴山区，百合，远缘杂交，胚抢救，杂种后代

中图分类号：Q943.1　　　　**文献标识码：**A

Breeding application of wild lily (*Lilium* spp.) species from Qin-Ba mountains

WANG Xianzhi[1,2]，NIU Lixin[1]，XIE Songlin[3*]，LUO Jianrang[1]

基金项目：国家自然科学基金（30571523）；公益性行业项目（200903020）[Supported by the National Natural Science Foundation of China 30571523)；the National Fundation for Non-Profit Sector (200903020)]。

作者简介：王仙芝（1982-），女，山西朔州人，博士，主要研究方向为园林植物遗传育种，（E-mail）xianzhi1015@163.com。

***通信作者：**谢松林，博士，教授级高级工程师，研究方向为园林植物种植资源与遗传育种，（E-mail）xiesonglin0726@hotmail.com。

(1.*College of Landscape Architecture and Art, Northwest A&F University,* Yangling 712100, Shannxi, China; 2. *China Merchants Zhangzhou Development Zone Co., Ltd*, Zhangzhou 363000, Fujian, China; 3. *Sichuan Colorlink Corp., Ltd,* Bazhong 636600, Sichuan, China)

Abstract: With the aim of exploring the application direction and approach of wild lilies from Qin-Ba mountains in breeding and obtain breeding materials with specific genetic background, with the help of cut-style pollination and embryo rescue, 6 species from Qin-Ba mountains, 1 cultivar from Asiatic hybrids (AA), 3 cultivars from Oriental hybrids (OO) and 3 cultivars from OT hybrids (OT) were selected for interspecific hybridization, and 32 crossing combinations, with a total of 263 flowers, were taken, embryo and embryo sac were cultured isolated from expanded seedpots. Results showed that: (1) There was a significant difference between different recombination, the general fruit setting rate was 11.4%, 30 expanded seedpots were taken for embryo rescue, 38 embryo (sac) were rescued and finally 7 plants were obtained. (2) Six hybrid plants were obtained in expanded seedpots of 5 crossing combinations from 12 crossing combinations when crossing between different lily species. (3) In addition to 'Elite' × *L. pumilum* can directly harvest seeds, 1 hybrid plants was obtained in expanded seedpots of 9 crossing combinations from 20 crossing combinations when crossing cultivars as mothers and species as fathers. (4) *Lilium Regale* and *L. leucanthum* were successfully used in interspecific hybridization of TT ×AA and backcross of OO ×TT, and hybrid plants were obtained. (5) There was a significant difference between lily species when using as crossing materials, more hybrids were got when crossing using species from Trumpet group (section Leucolirion) and no hybrid were obtained when crossing using species from section Archelirion and Sinomartagon. But *L. Brownii* did not get offspring. Results revealed that it was easier to obtain crossing hybrids when crossing was made between different lily species, TT ×AA crossing using L. regale, *L. leucanthum* as father with Asiatic cultivars, TT ×AA crossing using *L.duchartrei* as father, and OT×TT crossing using OT cultivars as mother and *L. regale*, *L. leucanthum* as father were new ways to breed new lily cultivars; the way of using *L. brownii* still need to be explored.

Keywords: Qin-Ba mountains, *Lilium*, interspecific hybridization, embryo rescue, ploidy level

百合是百合科百合属(*Lilium* spp.)植物的统称，因其花大色艳、类型多样深受世界各国人民喜爱，成为世界第五大切花，也被广泛用于盆栽及园林美化。随着经济发展和生活水平提高，人们对百合类型有了更广泛的需求，也对百合育种提出更高要求。为打破百合远缘杂交受精前障碍，20 世纪 60 年代，切割柱头和柱头移植被成功应用于百合（Myodo，1962）。20 世纪 90 年代，试管受精被证实可帮助花粉顺利到达子房（Van Tuyl et al.，1992；Van Creij et al.，2000）。20 世纪 70 年代，打破受精后障碍的胚培养（Myodo，1975），子房切片培养（Straathof et al.，1987）等先后被应用于百合。尤其胚挽救技术，不仅在葡萄（温晓敏，2018）、十字花科（赵艳艳等，2016）等多种植物中被广泛应用，在百合杂交中经过不断比较细化（谢松林等，2010；邵阳等，2014），已形成较为成熟的技术体系。目前，切割柱头、柱头移植结合胚抢救等技术成为百合远缘杂交的主要方式(Van Tuyl et al.，1991；Nhut et al.，2001；Nhut et al.，2002)，获得了大量的商业品种。

截至 2007 年，百合品种数目已经超过 13000 个（Int Lily register，1985-2007）。21 世纪以来，远缘杂交已经成为百合育种的主要方式（Van Tuyl & Lim，2003），育种家以综合百合属 9 个杂种系的百合品种优良性状作为育种目标，形成远缘杂种及多倍体的 LA（Longiflorum ×Asiatic）、OA（Oriental×Asiatic）、OT（Oriental ×Trumpet）和 LO（Longiflorum × Oriental）等具有更多优良特性的新品种，并在百合市场的份额越来越大，且有替代传统亚洲百合、东方百合及麝香百合的趋势(Van Tuyl & Arens，2010)。随着市场需求的改变及育

种目标的调整，国际百合育种开始不局限于品种与品种之间的杂交，逐渐开始挖掘新的野生资源对现有品种进行改良，因此野生百合资源再次成为百合育种中的重要材料。以分布于云南的紫斑百合为例，云南农业大学已陆续将其和栽培百合杂交，获得一系列杂种后代（郭朋辉等，2019）。全世界野生百合资源共 100 余种，东亚和北美分别有 62 和 21 个野生种(Van Tuyl et al.，2011)。但商业百合育种中所使用的野生百合亲本仅占百合属极少部分，最重要的四大杂种系，亚洲百合杂种系（Asiatic hybrid group，AA）、麝香百合杂种系（Longiflorum hybrid group，LL）、东方百合杂种系（Oriental hybrid group，OO）、喇叭百合杂种系（Trumpet hybrid group，TT）培育过程中所使用的百合野生种共计 23 个，占百合属总数量的比例不足 25%。喇叭百合主要亲本仅 2 种（McRae，1998）；花香浓烈且对灰霉病具一定抗性的东方百合仅源于具叶柄组 6 个野生种杂交而来（Barba-Gonzalez et al.，2004; Beattie & White 1993；McRae 1998）；对病毒及镰刀菌具较强抗性且花色多样的亚洲百合源于卷瓣组（Sinomartagon）内种间杂交(Van Heusden et al.，2002)，其亲本也只有 12 个野生种。因而，野生百合在百合育种中仍然有巨大的利用空间。

我国在百合野生资源分布中占有垄断性地位，共有 55 个种及变种，西南山区，秦巴山区及东北地区是其分布中心(赵祥云等，1991)。秦巴山区野生百合资源在百合品种培育过程中曾做出过卓越贡献。岷江百合由于其优良的抗性成为西方园林百合的优选并为培育出新的喇叭百合材料；川百合及山丹是亚洲百合杂种系培育过程中的重要亲本；湖北百合是亚洲百合和很多东方百合的重要亲本之一（McRae，1998）。但是综合看来，野生资源的各种优良特性尚未充分发挥，其挖掘和育种中的利用尚有巨大潜力。宝兴百合、宜昌百合、野百合尚未在百合育种中得到应用，岷江百合、川百合、山丹的优良抗病毒及蚜虫特性也未充分发挥（王仙芝等，2008）。

因而，为了探索秦巴山区野生百合资源在未来百合育种中的应用方向及途径，获得具有其独特遗传背景的育种材料，将秦巴山区野生百合的抗病毒及独特观赏特性等优良遗传性状渐渗到栽培品种中去，本文利用经本实验室验证较为成熟的切割柱头杂交及胚抢救技术，通过秦巴山区野生百合之间，野生百合和栽培百合之间的杂交探讨其在育种过程中利用的可能性及途径，为未来百合品种改良提供方向、技术参考和材料基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选取野生百合及市场应用广泛的东方百合‘Sorbonne’、‘Siberia’和‘Marlon’，OT 杂交系的‘Yelloween’、‘Serano’、‘Corel'door’亚洲百合‘Elite’作为杂交亲本。栽培百合种球购自北京神州克劳沃园艺技术有限责任公司，百合资源圃标准种植条件下温室栽培。各种及野生种抗性及园林应用特性如表 1。

表 1 杂交亲本来源及特性

Table 1 Origin and characters of parents used for hybridization

种及品种 Species and cultivars	所属组及杂交系 Hybrid group	来源 Origin	特性 Character
岷江百合 *Lilium Regale*	喇叭花组 Leucolirion section	秦巴山区 Qin-Ba mountains	抗病毒 Virus resistant
宜昌百合 *L. leucanthum*	喇叭花组 Leucolirion section	秦巴山区 Qin-Ba mountains	苗期抗蚜虫 Aphid resistant in seedling stage
山丹 *L. pumilum*	卷瓣组 Sinomartagon	秦巴山区 Qin-Ba	抗蚜虫、抗病毒 Aphid and virus resistant

	section	mountains	
野百合 *L. Brownii*	具叶柄组 Archelirion section	秦巴山区 Qin-Ba mountains	抗蚜虫 Aphid resistant
宝兴百合 *L. duchartrei*	卷瓣组 Sinomartagon section	秦巴山区 Qin-Ba mountains	抗蚜虫、抗病毒、花色独特 Aphid and virus resistant, special flower color
川百合 *L.davidii*	卷瓣组 Sinomartagon section	秦巴山区 Qin-Ba mountains	花多、色彩艳丽 More flowers, flower color
‘Sorbonne’	东方百合杂种系 Oriental hybrid group	云南 Yunnan	花型优美，香味清新，无抗病毒性 Flower shape, fragrance, and virus susceptible
‘Siberia’	东方百合杂种系 Oriental hybrid group	云南 Yunnan	花型优美，香味清新 Flower shape, fragrance
‘Yelloween’	OT（2n=2x=24）OT hybrid group	云南 Yunnan	叶形秀丽，香味清新 Leaf shape and fragrance
‘Serano’	OT (2n=3x=36) OT hybrid group	云南 Yunnan	叶形秀丽，香味清新 Leaf shape and fragrance
‘Corel'door’	OT（2n=3x=36）OT hybrid group	云南 Yunnan	花型优美，香味清新 Flower shape and fragrance
‘Marlon’	东方百合杂种系 Oriental hybrid group	云南 Yunnan	叶形秀丽，香味清新 Leaf shape and fragrance
‘Elite’	亚洲百合杂种系 Asiatic hybrid group	云南 Yunnan	植株秀丽，花朵艳丽、花多 Plant shape, flower color and more flowers

1.2 花粉采集及生活力测定

盛开的百合花药放于培养皿中，25 ℃ 干燥过夜，变色硅胶阴干保存。杂交前一天取少许花粉在预先灭菌的花粉萌发培养基上过夜培养，培养基配方为 1/2MS+100 g 蔗糖+5 g 琼脂+20 mg 硼酸+200 mg 硝酸钙，pH=5.8，培养温度为 30 ℃。解剖镜下进行花粉活性检测，取 3 个视野统计萌发率，求其平均值。花粉萌发率计算公式如下：

萌发率=（萌发花粉数/观测花粉总数）×100%

1.3 切割柱头杂交

1.3.1 母本去雄

选即将开放的花蕾撕开花瓣，将未开裂的花药摘去，用锡箔纸包裹柱头防止其他花粉沾上。

1.3.2 杂交

将经测定花粉萌发率 80%以上的父本花粉预先准备好，在花开后第二天上午 9：00—11：00 间进行授粉。柱头切割至子房上部 3~4 mm 处，将柱头粘液涂抹到切割后的柱头上，棉签粘取足量花粉授到涂抹粘液后的剩余柱头上，锡箔纸包裹，两周后移去锡箔纸。详细记录杂交组合数量，离体培养前，统计坐果率：

坐果率=（膨大果实数/杂交花朵数）×100%

1.4 胚挽救

胚抢救参考谢松林等（2010）的方法进行。将胚放入培养基后每周检查胚的萌发情况，将萌发及生根的幼苗挑取到繁殖培养基上（Van Tuyl et al., 1991），统计单个膨大果实胚获得率、胚萌发率及杂种后代组成比例，各指标计算方法分别为：

$$\text{单个膨大果实胚获得率}=\frac{\text{胚及胚乳分离数}}{300\times\text{膨大果实数目}}\times100\%$$（按照正常发育情况下每膨大果实 300 粒胚珠计）

$$\text{胚萌发率}=\frac{\text{发育幼苗数}}{\text{胚及胚乳分离数}}\times100\%$$

2 结果与分析

所有收集父本花粉经授粉前萌发检测，其活力均大于 90%，因此可以作为父本进行杂交育种。

2.1 不同杂交组合的果实膨大及胚抢救萌发率结果

本实验共选取 6 种野生百合、7 种栽培百合进行了 32 组杂交，其中前 12 组为野生百合为父母本进行的杂交，后 20 组选栽培百合为母本野生百合为父本进行杂交，共对 263 朵花进行了杂交。杂交结果显示，32 个杂交组合共获得 30 个膨大的果实，坐果率为 11.4%。采集变软膨大的果实进行胚挽救，胚抢救过程见图版 I。在 25 个膨大的果实中，仅获得了 38 个可供离体培养的胚及胚乳，单个果实胚获得率仅为 0.5%。剥离出 38 个幼胚进行胚抢救，7 个萌发，萌发率为 18.4%（表 2）。

2.2 野生百合种间杂交结果表现

以秦巴山区野生百合资源为亲本的杂交结果在不同杂交组合之间呈现出较大的差异性。以野生百合为父母本的 12 组杂交组合中，5 组获得了膨大果实，分别为：岷江百合×川百合、岷江百合×宝兴百合、宝兴百合×岷江百合、宜昌百合×川百合、宜昌百合×宝兴百合和宜昌百合×山丹，坐果率在 20%到 60%之间；除去组合宝兴百合×岷江百合外，其它五个组合均得到了不同数目的幼胚进行抢救，共抢救幼胚 24 个；而以宜昌百合为亲本的三个组合（宜昌百合×川百合、宜昌百合×宝兴百合和宜昌百合×山丹）经胚抢救后共得到了 6 株杂交后代，表明宜昌百合为母本获得育种后代比率较高。

2.3 野生百合和栽培百合杂交结果表现

在栽培百合做母本，野生百合做父本的 20 组杂交中，共有 9 组获得了膨大果实，其果实膨大率位于 5.4%到 33.3%之间，分别为组合‘Elite’ ×山丹、‘Yelloween’ ×宜昌百合、‘Yelloween’ ×岷江百合、‘Serano’×宜昌百合、‘Serano’×野百合、‘Sorbone’×岷江百合、‘Sorbone’×野百合、‘Marlon’×野百合、‘Corel'door’×岷江百合。其中‘Elite’×山丹可直接收获种子，‘Yelloween’×宜昌百合、‘Yelloween’×岷江百合、‘Serano’×野百合、‘Sorbone’×岷江百合、‘Sorbone’×野百合 5 个杂交组合中剥离出 14 个幼胚进行培养，最终得到来自组合‘Yelloween’×岷江百合的 1 株杂交后代，栽培百合和野生百合杂交获得育种材料比率较低。

2.4 基于分类学及亲缘关系分析的杂交亲和性比较

宜昌百合、岷江百合属百合属喇叭花组 Leucolirion，本组野生种经种间杂交培育出喇叭百合杂种系（Trumpet，TT）；宝兴百合、山丹、川百合属百合属卷瓣组 Sinomartagon，本组野生百合经种间杂交培育出亚洲百合杂种系（Asiatic，AA）；野百合属百合属具叶柄组 Archelirion，本组野生百合经种间杂交培育出东方百合杂种系（Oriental，OO）。

本试验杂交组合包括组内杂交 AA×AA、OO×OO，组间杂交 TT×AA、AA×TT、AA×OO、OT×AA、OO×TT、 OO×AA 及回交 OT×TT、OT×OO。

AA×AA 组内杂交结果显示，宝兴百合和其它野生种及品种杂交均无法得到膨大的果实，而山丹和‘Elite’杂交，果实膨大率达到了 100%，可直接收获种子；OO×OO 中野百合和两个东方百合品种杂交均未得到任何膨大果实，表明组内自交获得后代成功率不一定高。

组间杂交 TT×AA、AA×TT、OO×TT 共计 7 个杂交组合获得了膨大的果实。TT×AA

获得了 6 株杂交后代，以 TT（岷江百合和宜昌百合）为母本，AA（川百合、宝兴百合和山丹）为父本的 5 组杂交组合中，全部可以获得膨大果实，且以宜昌百合为母本的三组胚抢救均获得成功。而以 AA 为母本，TT 为父本的 4 组杂交组合中，仅宝兴百合为母本，岷江百合为父本的杂交组合获得膨大果实，说明岷江百合和宝兴百合正反交都可以得到膨大果实，但反交未获得可抢救的胚及胚乳。结果表明，TT×AA 是组间杂交唯一获得杂交后代的组合方式。

所有的回交组合均得到了膨大的果实，并最终成功获得杂种后代 1 株，表明秦巴山区野生百合作为回交亲本成功率较高，可产生携带秦巴山区野生百合基因的中间材料。

2.5 基于不同野生种杂交应用的亲和性比较

不同野生种在 32 个杂交组合中的亲和性呈现较明显的差异性。岷江百合在和 OT 品种回交、TT×AA、OO×TT 组间杂交中的一些组合中均可获得不同数量的膨大果实，在以‘Yelloween’为母本的回交中成功获得 1 株杂种后代；宜昌百合为亲本的杂交组合中，不仅 OT×TT 回交获得了膨大果实及杂种后代，组间杂交 TT×AA 同样获得了膨大果实及杂种后代；野百合在组间杂交中无法获得膨大果实，在组内杂交 OO×OO3 个杂交组合中 2 个组合及 1 个 OT×OO 回交组合中获得了膨大果实，但未获取任何杂交后代；川百合在组间杂交 TT 和 AA 两个杂交组合中均成功获得膨大果实，但仅在和宜昌百合的杂交中获得了杂种后代，在 OT×AA，AA×OO，OO×AA 中均无法获得膨大果实；以山丹为亲本的杂交组合中，除组内杂交 AA×AA 获得了膨大果实，直接收获种子外，组间杂交 TT×AA 也获得了膨大果实，并最终通过胚抢救获得了 3 株杂种后代；宝兴百合在组内杂交 AA×AA，组间杂交 OO×AA，OT×AA 中均无法获得膨大果实及杂种后代，仅在宜昌百合作为母本 TT×AA 杂交中，有果实膨大最终并为获得杂种后代。

结果表明，秦巴山区 6 种野生百合中，属喇叭花组（TT）的岷江百合和宜昌百合作为杂交母本，AA 做为父本获得育种后代比率较高；属卷瓣组（AA）的山丹和川百合在自交和 TT×AA 杂交组合中可获得杂交后代，宝兴百合仅在 TT×AA 杂交组合中可获得杂交后代，属具叶柄组（OO）的野百合未获得后代。

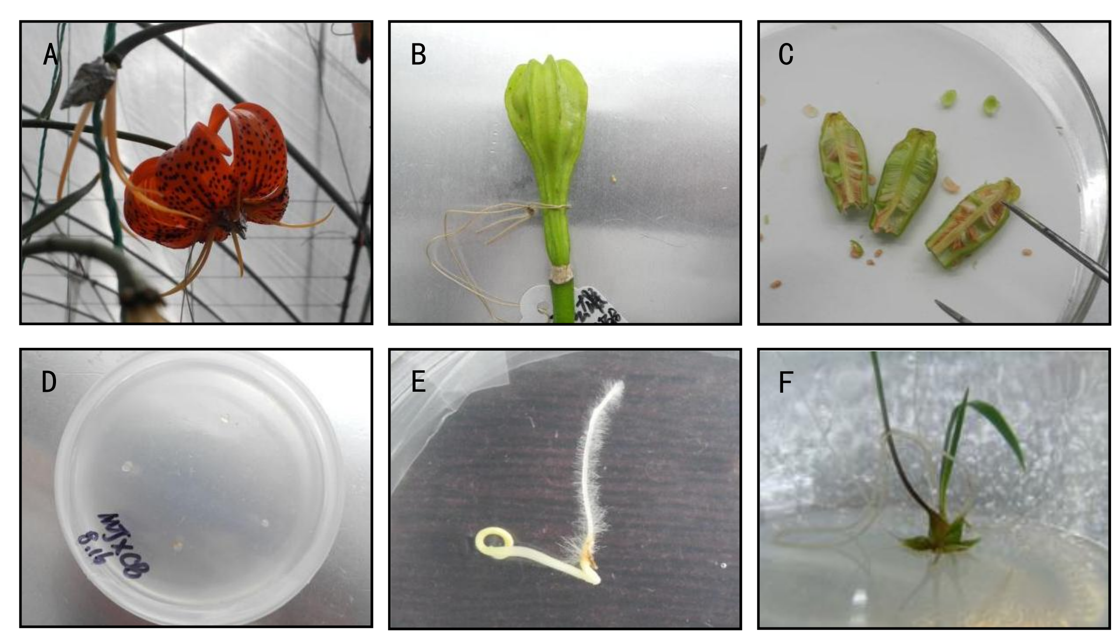
表 2 不同杂交组合杂交果实膨大及胚挽救效果比较

Table 2 Comparison of embryo rescue and expanded seedpots from different crossing combinations

序号 No.	杂交组合 Combination	母本 Female	父本 Male	杂交方法 Pollination method	杂交花朵数 Number of pollinated flower	膨大果实数 Number of expanded seedpot	坐果率 Fruit setting rate (%)	胚及胚乳培养数目 Number cultured	单个膨大果实胚获得率 Culture number expanded per seedpot(%)	萌发个数 Germination number	胚萌发率 Germination rate(%)
1	TT×AA	*Lilium regale*	*L.davidii*	切割柱头 Cut-style	6	2	33.3	7	1.2	0	0
2	TT×AA	*L. regale*	*L. duchartrei*	切割柱头 Cut-style	5	1	20	4	1.3	0	0
3	AA×TT	*L. duchartrei*	*L. regale*	切割柱头 Cut-style	3	1	33.3	0	0	0	0
4	AA×TT	*L. davidii*	*L. regale*	切割柱头 Cut-style	5	0	0	—	—	—	—
5	AA×AA	*L. davidii*	*L. duchartrei*	正常 Normal	5	0	0	—	—	—	—
6	AA×OO	*L. davidii*	*L. brownii*	切割柱头 Cut-style	4	0	0	—	—	—	—
7	AA×TT	*L. pumilum*	*L. regale*	切割柱头 Cut-style	2	0	0	—	—	—	—
8	AA×TT	*L. pumilum*	*L. leucanthum*	切割柱头 Cut-style	5	0	0	—	—	—	—
9	AA×OO	*L. pumilum*	*L. brownii*	切割柱头 Cut-style	4	0	0	—	—	—	—
10	TT×AA	*L. leucanthum*	*L. davidii*	切割柱头	5	3	60	4	0.4	2	50

序号 No.	杂交组合 Combination	母本 Female	父本 Male	杂交方法 Pollination method	杂交花朵数 Number of pollinated flower	膨大果实数 Number of expanded seedpot	坐果率 Fruit setting rate (%)	胚及胚乳培养数目 Number cultured	单个膨大果实胚获得率 Culture number expanded per seedpot(%)	萌发个数 Germination number	胚萌发率 Germination rate(%)
				Cut-style							
11	TT×AA	*L. leucanthum*	*L. duchartrei*	切割柱头 Cut-style	5	1	20	1	0.3	1	100
12	TT×AA	*L. leucanthum*	*L. pumilum*	切割柱头 Cut-style	5	2	40	8	1	3	37.5
13	AA×TT	'Elite'	*L. regale*	切割柱头 Cut-style	4	0	0	—	—	—	—
14	AA×AA	'Elite'	*L. duchartrei*	正常 Normal	4	0	0	—	—	—	—
15	AA×AA	'Elite'	*L. pumilum*	正常 Normal	5	5	100	直接收获种子 Seeds harvested directly	—	—	—
16	OT×AA	'Yelloween'	*L. davidii*	切割柱头 Cut-style	5	0	0	—	—	—	—
17	OT×TT	'Yelloween'	*L. leucanthum*	正常 Normal	37	2	5.4	2	0.3	0	0
18	OT×TT	'Yelloween'	*L. regale*	正常 Normal	47	4	8.5	6	0.5	1	16.7
19	OT×TT	'Serano'	*L. leucanthum*	正常 Normal	6	1	16.7	0	0	0	0
20	OT×OO	'Serano'	*L. brownii*	正常 Normal	6	2	33.3	2	0.3	0	0
21	OT×AA	'Serano'	*L. davidii*	切割柱头 Cut-style	8	0	0	—	—	—	—

序号 No.	杂交组合 Combination	母本 Female	父本 Male	杂交方法 Pollination method	杂交花朵数 Number of pollinated flower	膨大果实数 Number of expanded seedpot	坐果率 Fruit setting rate (%)	胚及胚乳培养数目 Number cultured	单个膨大果实胚获得率 Culture number expanded per seedpot(%)	萌发个数 Germination number	胚萌发率 Germination rate(%)
22	OT×AA	‘Serano’	*L. duchartrei*	切割柱头 Cut-style	7	0	0	0	0	0	0
23	OO×TT	‘Sorbone’	*L. regale*	切割柱头 Cut-style	13	1	7.7	2	0.7	0	0
24	OO×AA	‘Sorbone’	*L. duchartrei*	切割柱头 Cut-style	7	0	0	—	—	—	—
25	OO×AA	‘Sorbone’	*L. pumilum*	切割柱头 Cut-style	6	0	0	—	—	—	—
26	OO×OO	‘Sorbone’	*L. brownii*	正常 Normal	6	2	33.3	2	0.3	0	0
27	OO×OO	‘Siberia’	*L. brownii*	正常 Normal	7	0	0	—	—	—	—
28	OO×TT	‘Siberia’	*L.regale*	切割柱头 Cut-style	7	0	0	—	—	—	—
29	OO×AA	‘Siberia’	*L. davidii*	切割柱头 Cut-style	7	0	0	—	—	—	—
30	OO×AA	‘Siberia’	*L. duchartrei*	切割柱头 Cut-style	7	0	0	—	—	—	—
31	OO×OO	‘Marlon’	*L. brownii*	正常 Normal	6	2	33.3	0	0	0	0
32	OT×TT	‘Corel'door’	*L. regale*	正常 Normal	14	2	14.3	0	0	0	0
总数 Total	—	—	—	—	263	30	11.4	38	0.5	7	18.4



A. 切割柱头杂交；**B.** 膨大的果实；**C.** 百合胚珠（箭头所指为可进行离体培养的胚珠）；**D.** 分离出的胚乳；**E.** 萌发的胚乳；**F.** 长大的植株。

A. C by cutting stigma；**B.** Expanded seedpot of lily after pollinatio；**C.** Ovules in the seedpot (Arrows for ovules can be *in vitro* culture) ；**D.** Embryo sac culture；**E.** Germinated embryo sac；**F.** Developing into plant.

图版Ⅰ 百合杂交及胚乳离体培养获得植株流程图

Plate Ⅰ Process of *in vitro* culture of young embryo to a plant of lily hybrids

3 讨论

3.1 野生百合种间杂交与野生百合和栽培百合杂交的结果的影响因素

国外学者利用形态学，杂交亲和性及 DNA 保守序列将百合属分为七个组，分别为轮叶组（Martagon section）、根茎组（Pseudolirium section）、百合组（Liriotypus section）、具叶柄组（Archelirion section）、卷瓣组（Sinomartagon section）、喇叭花组（Leucolirion section）和毛百合组(Daurolirion section)，其中具叶柄组和喇叭花组及卷瓣组亲缘关系较近(Comber，1949；De Jong，1974；Nishikawa et al.，2007），这和本试验研究结果相符。本研究结果显示，较以栽培百合为母本，野生百合为父本的杂交组合而言，野生百合种间杂交更易获得育种后代，这说明所选取的野生百合种间的亲缘关系较近。同时，杂交结果同样受杂交母本雌育性的影响，由于栽培百合经过多代杂交，其育性相比于野生百合难免降低，尤其是栽培百合中的 OT 品种，其来源是东方百合及喇叭百合的回交一代，作为异源三倍体在减数分裂中会呈现诸多异常现象，如单价体，三价体及四价体等，引起第一次减数分裂不均衡分离，进而产生非整倍体花粉并导致育性大幅降低（Luo et al.，2013；Zhou et al.，2014）。因此，就秦巴山区野生百合和栽培百合品种间的亲缘关系而言，其判断依据稍显不足，有必要在后期杂交育种中加大杂交组合数量或尝试将野生百合作为母本杂交材料进行杂交育种，从而获得有力依据。

3.2 切割柱头杂交及胚抢救是秦巴山区野生百合利用的有效技术手段

远缘杂交已经成为百合育种的主要方式（Van Tuyl & Lim，2003）。本研究中以山丹为亲本的一个组内杂交组合可直接收获种子。这和前人研究经验相同。De Jong（1974）和 McRae（1998）对世界范围内的百合野生种进行了育种技术研究，结果证实百合属组内杂交一般容易取得成功，杂交过程中不需要借助特殊方法的帮助，而组间杂交较难获得杂种后代且杂种

后代高度不育，需要借助特殊授粉手段及幼胚抢救技术（Van Tuyl et al.，1991；Nhut et al.，2001；张睿婧等，2012；刘晓丽等，2012；周树军，2014；王欢等，2017）。本研究以岷江百合和宜昌百合为亲本的 TT×AA 杂交成功获得杂种后代，而以野百合和宝兴百合为亲本的部分组内杂交组合未得到杂交后代，其原因可能是野百合及宝兴百合由于亲缘关系较远引起常规杂交失败，进而导致尚未在百合育种中应用；因此，在运用百合野生种材料进行育种特别是和栽培品种杂交时，不仅组间远缘杂交需要借助切割柱头授粉及胚抢救技术，组内杂交同样需要借助此类技术。

三倍体 OT 品种虽然雄性高度不育，但作为母本可以实现百合种质的渗入育种（袁国良等，2013）。本试验同样证实一些三倍体 OT 品种虽然雄性高度不育，但是作为母本和秦巴山区野生百合材料进行杂交，依然得到了少许杂种后代，和前人研究结果相符(周树军，2014；Zhou et al.，2014），这也为秦巴山区野生百合对病毒和蚜虫等具有较强抗性特征的资源利用提供了良好的实践依据。

3.3　秦巴山区野生百合育种应用途径

针对每个野生种制定合适的育种路径是秦巴山区野生百合育种应用的重要前提。育种成功与否和杂交亲本的亲缘关系密不可分，研究证实，具叶柄组和喇叭花组及卷瓣组亲缘关系较近（Comber，1949；De Jong，1974；Nishikawa et al.，1999），这也说明 LA、OA、OT 及 LO 杂交组合结合新的育种技术相对容易取得成功，同时也是类似新品种在市场上不断涌现的原因。国内学者以东方百合杂交品种‘Constanta’为母本，岷江百合为父本，结合胚抢救方法成功得到杂种后代（张睿婧等，2012），钟蕾发现 OT 百合品种‘仙女’和‘粉冠军’雌性可育而雄性不育（钟蕾，2016）。同时，具叶柄组的 *L. nobilissimum* （培育东方百合亲本之一）和岷江百合也成功进行了杂交（Obata et al.，2000），本试验以岷江百合为亲本进行的 OO×TT 杂交组合成功得到了膨大果实及幼胚进行了抢救同样说明了这一点。

同时，该文以岷江百合及宜昌百合为亲本的远缘杂交 TT×AA 均成功获得杂种后代说明两种野生百合和亚洲百合亲缘关系较近，有望开拓新的育种方向，进而更快的将尚未利用的宜昌百合在育种中发挥其植株健壮高大，蚜虫抗性强的优势。另外，本试验以岷江百合及宜昌百合为亲本的 OT×TT 回交也成功获得杂种后代，验证了异源三倍体作为桥梁进行育种的可行性（袁国良等，2013），为岷江百合及宜昌百合的快速利用提供了另一条捷径，有望在一次回交后筛选出优良新品种。

值得注意的是虽然宝兴百合同属于卷瓣组，但和其他卷瓣组百合野生种及亚洲百合品种的杂交并不能获得成功，这和 McRae(1998)研究得到宝兴百合非亚洲百合野生亲本结论相吻合，也可能是亚洲百合的 12 个杂交亲本中不包括宝兴百合的原因。因而，宝兴百合组内杂交途径尚需要进一步研究。然而本研究发现宝兴百合在和宜昌百合的杂交（TT×AA）中有成功获得后代，说明宝兴百合的育种可通过和 TT 杂交开展，为未来宝兴百合的杂交应用开辟了一条新途径。

野百合的育种应用途径需继续探索。野百合不仅分布于中国，同时分布于日本，但作为具叶柄组成员却不是东方百合的亲本，本试验以野百合为亲本的 6 个杂交组合有 3 组得到膨大果实，但未得到杂种后代，下一步工作需要以组内杂交为主，结合特殊授粉方法及胚抢救技术寻找合适杂交亲本，并尝试将野生百合作为母本杂交材料进行杂交育种。

参考文献：

BARBA-GONZALEZ R, LOKKER AC, LIM KB, RAMANNA MS, et al., 2004. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental×Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*) [J]. Theor Appl Genet, 109(6): 1125-1132.

BEATTIE DJ, WHITE JW, 1993. *Lilium* hybrids and species. The physiology of flower bulbs. Edited by A. A. de Hertogh and M. Le Nard[M]. 423-454.

COMBER H, 1949. A new classification of the genus *Lilium*. Royal Hort Soc, Lily Yearbook North Am Lily Soc[J]. 13: 85-105.

DE JONG P, 1974. Some notes on the evolution of lilies. The Lily Yearbook of the North Am Lily Soc[M]. 27: 23-28.

GUO P, WU J, WANG Y, ZHENG R, WU H, 2019. Compatibility and overcoming of distant hybridization of *Lilium nepalense* and hybridization obstacles [J]. J S Agric, 50(9):1903-1912. [郭朋辉，吴景芝，王玉英，郑冉冉，吴红芝，2019. 紫斑百合远缘杂交亲和性分析及杂交障碍克服[J]. 南方农业学报，50(9)：1903-1912.]

LIU XL, LI WY, JIA GX, 2012. Cross compatibility of 11 species of wild lilies [J]. J Beijing Forestry University, 34(3) :85-90. [刘晓丽，李文媛，贾桂霞，2012. 11 种野生百合杂交亲和性的初步研究[J]. 北京林业大学学报，34(3)：85-90.]

LUO JR, VAN TUYL JM, ARENS P, NIU LX, 2013. Cytogenetic studies on meiotic chromosome behaviors in sterile Oriental x Trumpet lily [J]. Genet Mol Res, 12(4): 6673-6684.

MCRAE EA, 1998. Oriental lily hybrids in Lilies; a guide for growers and collectors [M]. Timber press, Portland, Oregon, 1998: 239-257.

MYODO H，1962. Experimental studies on the sterility of some *Lilium* species [J]. J Facul Agr Hokkaido Univ, 52: 71-122.

MYODO H，1975. Successful setting and culture of hybrid embryos between remote specie of the genus *Lilium* [J]. Lily Yearbook North Am Lily Soc, 30: 7-17.

NHUT DT, LE BV, VAN KTT, 2001. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 37: 44-49.

NHUT DT, VAN LE B, MINH NT, DE SILVA JT, et al., 2002. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum* [J]. Plant Growth Reg, 37 (2): 193-198.

NISHIKAWA T, OKAZAKI K, UCHINO T, ARAKAWA K, et al., 1999. A molecular phylogeny of *Lilium* in the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA[J]. J Mol Evol 49: 238-249.

OBATA Y, NIIMI Y, NAKANO M, OKAZAKI K, MIYAIIMA I, 2000. Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *L. regale* produced via ovules-with placental- tissue culture. [J]. Sci Hortic, 84: 191-204.

SHAO Y, WEN WH, CUI JT, et al., 2014. Study on the Pollination Methods and Embryo Rescue Techniques of the Crosses among *Lilium* Oriental Hybrids[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 34(6): 1119-1124. [邵杨，温韦华，崔金腾，等，2014. 东方百合系内杂交授粉技术与胚抢救技术研究[J]. 西北植物学报，34(6)**:** 1119-1124.]

STRAATHOF TP, VAN TUYL JM, KEIJZER CJ, Wilms H J, Kwakkenbos A A M, van Di n M P. , 1987. Overcoming post-fertilization barriers in *Lilium* by ovary- and ovule culture[J]. Plant Cell Incomp Newslett, 19: 69-74.

VAN CREJJ MGM, KERCKHOFFS DMFJ, VAN TUYL JM, 2000. Application of four pollination techniques and of hormone treatment for bypassing interspecific crossing barriers in *Lilium* [J]. Acta Hortic, 508: 267-276.

VAN HEUSDEN AW, JONGERIUS MC, VAN TUYL JM, et al., 2002. Molecular assisted breeding for disease resistance in lily[J]. Acta Hortic, 572: 131-138.

VAN TUYL JM, ARENS P, RAMANNA MS, et al., 2011. *Lilium*. Kole (ed), Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops[M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 161-183.

VAN TUYL JM, VAN CREJJ MGM, VAN DIN MP, 1992. In vitro pollination and ovary culture as a breeding tool for wide hybridization of *Lilium* and *Nerine*[J]. Acta Hortic, 325: 461-466.

VAN TUYL JM, VAN DIEN MP, VAN CREIJ MGM, et al., 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses[J]. Plant Sci, 74: 115-126.

VAN TUYL JM, LIM KB, 2003. Interspecific hybridisation and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding[J]. Acta Hortic, 612 :13-22.

VAN TUYL JM, ARENS P, 2010. *Lilium*: Breeding History of the Modern Cultivar Assortment[J]. Acta Hortic, 900: 223-230.

WANG H, KONG Y, LANG LX, et al., 2017. Genetic analysis of important characters in F1 hybrids of *Lilium* Asiatic hybrids and *L. leichtlinii* var. *maximowiczii*[J]. Acta Agric Boreali-Sinina, 32(4) :114-121. [王欢，孔滢，郎利新，等，2017. 亚洲百合与大花卷丹杂种 F1 重要性状的遗传分析[J]. 华北农学报，32(4)：114-121.]

WANG XZ, ZHANG YL, NIU LX et al., 2008. Identification of three kinds of virus, and the preliminury evaluation on the resistance to the virus in six wild *Lilium* species from Qin-Ba mountains under the nursery field[J]. CASS, 41(11): 3618-3625. [王仙芝，张延龙，牛立新，等，2008. 秦巴山区六种野生百合感染 3 种病毒病鉴定及其田间抗病性初步评价[J]. 中国农业科学，41 (11)：3618-3625.]

WEN XM, 2018. Hybrid strain identificating and embryos rescue breeding of Himrod Seedless grape as parent[D]. Tianjin Normal University. [温晓敏，2018. 以‘希姆劳特’葡萄品种为亲本的胚挽救育种与杂交株鉴定[D]. 天津：天津师范大学]

XIE SL, WANG XZ, NIU LX, et al., 2010. Overcoming cross barriers and obtaining crossing hybrids betwen different hybrid groups of lily (*Lilium*)[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin 30(8):1573-1578. [谢松林，王仙芝，牛立新，等，2010. 百合杂种系间杂交障碍的克服及 3 种幼胚离体培养方法的比较研究[J]. 西北植物学报，30(8)：1573-1578.]

YUAN GL, XU P, GONG HX, et al., 2013. Lily (*Lilium*) introgression breeding using triploid cultivars as maternal parents [J]. J Agric Biotechnol, 21（11）:1321-1327. [袁国良，徐萍，宫红霞，等，2013. 用三倍体作母本实现百合种质渗入育种[J]. 农业生物技术学报，21(11)：1321-1327.]

ZHANG RJ, JIANG S, XI ML, et al., 2012. Distant hybridization of *Lilium* var‘Constanta’× *Lilium regale* Wilson and the hybrids identification[J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 36(3) :23-27.[张睿婧，姜珊，席梦利，等，2012. 百合远缘杂交及其杂种鉴别研究[J]. 南京林业大学学报：自然科学版，36(3)：23-27.]

ZHAO XY, CHEN XL, WANG SD, 1991. *Lilium* species in Qin-Ba mountains[J]. Plants, 18(5): 22-24. [赵祥云，陈新露，王树栋，1991. 秦巴山区的百合花[J]. 植物杂志，18(5): 22-24.]

ZHAO YY, JIANG WS, YUAN YX, et al., 2016. Embryo Rescue of *Brassica oleracea*

L．var．*capitata*× *Brassica napus* L．and their ploidy identification[J]. J Henan Agric Sci, 45(9): 88-93. [赵艳艳，蒋武生，原玉香，等，2016. 结球甘蓝与油菜杂交胚挽救及其后代倍性鉴定[J]. 河南农业科学，45(9)：88-93.]

ZHONG L, 2016. A study on the differences of male and female fertility of "OT" Lily Cultivar ’Fairy’ and ’Pink Champion’[D]. Nanchang: Jiangxi Agriculture University. [钟蕾，2016. 百合“OT”品种‘仙女’和‘粉冠军’雌雄育性差异研究[D]. 南昌：江西农业大学]

ZHOU SJ, 2014. Technical ways of breeding modem lily (*Lilium*) cultivars and the mechanisms of the special phenomena of their hybridizations[J]. J Agric Biotechnol, 22(10):1189-1194. [周树军，2014. 现代百合品种培育的技术途径及其杂交特殊现象的机制[J]. 农业生物技术学报，22(10)：1189-1194.]

ZHOU S, YUAN G, XU P, GONG H, 2014. Study on lily introgression breeding using allotriploids as maternal parents in interploid hybridizations[J]. Breed Sci, 64: 97-102